

ФЕДЕРАЛЬНОЕ АГЕНТСТВО ПО ОБРАЗОВАНИЮ  
УРАЛЬСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ  
им. А. М. ГОРЬКОГО

# **МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ФИТОГОРМОНОВ:**

**твёрдофазный иммуноферментный  
анализ абсцизовой кислоты,  
ауксинов и цитокининов**

**Руководство к лабораторным занятиям  
большого спецпрактикума  
по физиологии и биохимии растений**

**Направление 020200 «Биология»  
Специальность 020201 «Биология»**



Екатеринбург  
Издательство Уральского университета  
2006

Руководство к лабораторным занятиям  
подготовлено кафедрой физиологии  
и биохимии растений

Составитель Р. А. Борзенкова

Утверждено  
учебно-методической комиссией  
биологического факультета  
19 декабря 2005 г.

### **От составителя**

Руководство к лабораторным занятиям предназначено для студентов 3–5 курсов, магистрантов и аспирантов, специализирующихся на кафедре физиологии и биохимии растений и слушающих спецкурс «Фитогормоны». Оно имеет несколько целей:

1. Ознакомить учащихся с разнообразием существующих методов фиксации, выделения и количественного определения эндогенных фитогормонов в растительных тканях.

2. Помочь при выборе тех методов, которые более всего соответствуют выдвигаемым задачам и возможностям во время подготовки бакалаврских, магистерских и аспирантских работ.

3. Практически освоить один из наиболее распространенных в настоящее время методов – метод иммуноферментного анализа фитогормонов, в частности один из его вариантов – конкурентный твердофазный иммуноферментный анализ (ТФИФА).

# КРАТКАЯ ТЕОРИЯ

## Критерии и свойства фитогормонов

Фитогормоны — это органические сравнительно низкомолекулярные эндогенные регуляторы физиологических процессов у растений. Д. А. Сабинин дал следующее определение фитогормонам: «Во-первых, вещества этого рода должны обладать способностью в небольших количествах вызывать прохождение не только отдельных химических процессов, как это имеет место при действии ферментов, а физиологических процессов, протекающих на основе целой цепи физических и химических изменений. Во-вторых, фитогормоны должны образовываться в растительном организме, будучи продуктом обмена веществ организма. В-третьих, они должны действовать и в иных частях организма, чем те, где они вырабатываются» (Сабинин, 1963, с. 48). В настоящее время четко определены критерии и свойства фитогормонов, по которым к ним может быть отнесено то или иное вещество. Многие из них являются общими с таковыми для животных гормонов.

1. Фитогормоны выполняют роль регуляторов целых физиологических или морфологических программ (деление и рост клеток, их дифференцировка, созревание, покой, цветение и т. д.), которые осуществляются на основе многих биохимических и биофизических процессов. Этим они отличаются от витаминов и ферментов, регулирующих отдельные реакции и метаболические пути обмена веществ клетки. Фитогормоны регулируют направленность всего метаболизма клетки, вызывая изменения ее структурной организации и функциональной активности.

2. Фитогормоны синтезируются в самом растении (эндогенный регулятор).

3. Фитогормоны обладают очень высокой физиологической активностью, проявляя свою регуляторную функцию в концентрациях на несколько порядков меньших ( $10^{-8}$ — $10^{-5}$  *M*), чем концентрации, в которых нужны растению вещества субстратного характера.

4. Фитогормоны участвуют в дистанционном действии одних тканей или органов на функциональное состояние и осуществление физиологических программ в клетках других тканей и органов. Хотя у растений нет специальных желез внутренней секреции, как у животных, тем не менее существует приуроченность синтеза фитогормонов к определенным тканям и органам, которые влияют на другие ткани и органы. Тем самым фитогормоны осуществляют взаимодействие различных частей растительного организма. Однако фитогормоны могут проявлять регуляторное действие непосредственно в клетках той ткани, где они синтезируются. Следовательно, они объединяют в себе функции истинных гормонов, обладая дистанционным действием, и гистогормонов (тканевых гормонов) животных.

5. Каждый фитогормон полифункционален, т. е. участвует в регуляции многих физиологических процессов у растений. Например, гиббереллины регулируют прорастание семян, удлинение стебля, цветение, формирование пола. Цитокинины участвуют в индукции деления клеток; активируют процессы, связанные со структурной и биохимической дифференцировкой хлоропластов; задерживают старение листьев; регулируют распределение ассимилятов в растении, обладая сильным аттрагирующим действием и др.

6. Действие каждого фитогормона высокоспецифично, и производимый им эффект зависит от специфики как гормона, так и объекта, т. е. от его видовых, органных, тканевых, возрастных и физиологических особенностей, которые определяют компетентность клетки отвечать на гормон и характер этого ответа. Например, только абсцизовая кислота (АБК) обладает способностью быстро закрывать устьица; задержка старения листьев свойственна

цитокининам, а эпинастические изгибы и ускорение созревания плодов — этилену и т. д.

7. Действие фитогормона на чувствительные к нему растительные объекты находится в строгой зависимости от его концентрации. В определенном пределе концентраций ответ растительной ткани на фитогормон прямо пропорционален логарифму его концентрации. Оптимальные концентрации действия гормона и ход кривой зависимости эффекта от концентрации фитогормона значительно варьируют у различных растительных объектов. Концентрации гормона, которые существенно выше или ниже оптимальной, либо не эффективны, либо вызывают ингибирующее действие.

8. Действие фитогормонов проявляется в тесном взаимодействии с факторами питания и зависит от условий, в которых находятся растения. Например, в условиях дефицита минерального или углеродного питания реакция растений на цитокинин не проявляется.

9. Система гормональной регуляции жизнедеятельности растений многокомпонентна, т. е. в регуляции одного и того же физиологического процесса может принимать участие не один, а несколько гормонов. Это не противоречит специфичности действия каждого фитогормона, так как каждый фитогормон играет определенную роль в системе гормональной регуляции какой-либо физиологической программы. Вместе с тем разные типы взаимодействий фитогормонов осложняют анализ специфичности их действия и в то же время свидетельствуют о существовании единой гормональной системы растения. Взаимодействие фитогормонов может проявляться последовательно, в том числе каскадно, когда один гормон индуцирует синтез другого. Между гормонами может проявляться как синергизм, так и антагонизм. Характер взаимодействия между гормонами непостоянен и может меняться в зависимости от регулируемого процесса, тканевой специфичности клеток, трофических факторов и т. д. Все это обеспечивает тонкую настройку физиологических процессов в растении в ответ

на изменение внешних условий или при метаболических перестройках в ходе онтогенеза растений.

Гормональная система растений включает несколько классов. Традиционно к ним относят пять классов:

1. Ауксины —  $\beta$ -индолилуксусная кислота и ее производные.

2. Гиббереллины — большое семейство близкородственных соединений, относящихся к классу дитерпенов (С-20 соединения).

3. Цитокинины — производные 6-аминопурина с заместителем в аминогруппе при шестом атоме углерода пуринового кольца (зеатин, его аналоги и производные).

4. Абсцизовая кислота — оптически активный сесквитерпеноид (С-15), в растениях наиболее широко распространен (+)-энантиомер 2-*цис*-4-*транс*-АБК.

5. Этилен — ненасыщенный углеводород, газообразное вещество, выполняющее роль регулятора физиологических процессов.

В последние годы к фитогормонам стали относить *брассиностероиды, салициловую и жасминовую кислоты, фузикокцины*. Однако эти соединения, как регуляторы физиологических процессов, изучены еще недостаточно и нет единого мнения относительно того, отвечают ли они всем критериям и свойствам фитогормонов и включаются ли в единую гормональную систему растений.

Для выяснения того, как тот или иной гормон осуществляет регуляцию физиологических функций, какова их роль в ответной реакции растения на факторы внешней среды и адаптации к ним, требуется детальный анализ эндогенного гормонального статуса растения. Предполагается, что регуляторная функция гормонов реализуется в основном через изменение их концентрации, которая в каждый определенный момент является результатом процессов синтеза, распада, транспорта, взаимопревращений свободных и связанных форм гормона. Важно знание роли каждого из этих процессов в регуляции концентрации

гормона. Особенно это необходимо при использовании экзогенных регуляторов роста в практике растениеводства, поскольку их эффект зависит от содержания эндогенных фитогормонов. В свою очередь, знание лимитирующего звена в создании оптимальной концентрации гормона в различных органах растения позволяет повысить эффективность применения экзогенных регуляторов направленного действия.

### **Способы фиксации и выделения фитогормонов из растительных тканей**

Определение фитогормонов в растительной ткани технически трудоемкий процесс, так как они содержатся в микроколичествах и в клетках им сопутствует множество молекул, близких к ним по физико-химическим свойствам. Это требует отделения гормона от сопутствующих веществ, что достигается либо длительной очисткой, либо за счет селективности детекции. Для выделения гормона из растения необходима подготовка растительного материала для анализа — его фиксация. Последующее выделение включает экстракцию, очистку от примесей, фракционирование, идентификацию и количественное определение. Способ фиксации материала, выбор экстрагента, способы и степень очистки зависят как от физико-химических свойств фитогормона и стабильности его молекулы, так и от метода последующего количественного определения и поставленных задач.

Выделение цитокининов пуринового ряда из растительного материала основано на их следующих свойствах: они слабо растворимы в холодной воде, при нагревании растворимость в воде увеличивается; хорошо растворимы в органических растворителях (этанол, этиловый эфир, метанол, бутанол, этилацетат, ацетон), в растворах щелочей и кислот. Цитокинины устойчивы к нагреванию, автоклавированию, действию щелочей и кислот. Поэтому можно



применять фиксацию материала горячим спиртом. Для экстракции используют обычно водный этиловый или метиловый спирт. Некоторые авторы перед экстракцией растительный материал замораживают в жидком азоте и лиофильно высушивают. Из кислых растворов цитокинины могут быть осаждены солями серебра или бария; при  $\text{pH} = 2,5$  извлекаются с помощью катионитов (например, Даякс), из щелочных растворов ( $\text{pH} = 10$ ) — анионитами (Амберлит). Из водной фазы при  $\text{pH} = 7,0\text{—}7,8$  цитокинины легко переходят в водонасыщенный бутанол, при  $\text{pH} = 3$  — в этилацетат. Они поглощают в ультрафиолете в пределах  $260\text{—}275$  нм, что позволяет обнаружить локализацию цитокининов на хроматограммах. Свет ускоряет разрушение цитокининов.

Определение ауксина  $\beta$ -индолилуксусной кислоты (ИУК) осложняется тем, что она, в отличие от цитокининов, обладает химической неустойчивостью при низких  $\text{pH}$  в присутствии следовых количеств железа. В чистом виде легко окисляется на воздухе и на свету, особенно в присутствии желтых пигментов. Поэтому для уменьшения окислительного разрушения ИУК во время экстракции в растворы добавляют антиокислители меркаптоэтанол или диэтилдитиокарбамат натрия. ИУК — очень слабая органическая кислота. Она растворима в этаноле, метаноле, ацетоне, этилацетате, серном эфире, хлороформе. Нерастворима в петролейном эфире, толуоле и других неполярных растворителях. В воде ИУК растворяется слабо, ее растворимость возрастает при увеличении  $\text{pH}$  и нагревании. В растворе при  $\text{pH}$  ниже 5 ИУК находится в виде недиссоциированных молекул и в этом состоянии легко переходит из воды в органические растворители. При  $\text{pH}$  более 7 она диссоциирует, в форме аниона ее переход из воды в органические растворители затруднен. На этих свойствах основаны первоначальные этапы выделения и очистки ИУК. Как и другие индольные вещества, ИУК поглощает в ультрафиолете (максимум при 279 нм) и флуоресцирует в фиолетовой части спектра, что используется для обнаружения на хроматограммах.

Наиболее щадящим способом фиксации растительного материала при определении ИУК является замораживание в жидком азоте. Если требуется длительное хранение, то лучше всего его заморозить и хранить при  $-30^{\circ}\text{C}$  либо лиофильно высушить и лиофилизированный материал хранить над обезвоженным сульфатом натрия или хлористого кальция при  $0...+2^{\circ}\text{C}$ . Если зафиксированный азотом материал анализируется сразу, то его гомогенизируют на холоде и ведут экстракцию охлажденным метанолом или этанолом. Однако имеются сведения, что фиксация в жидком азоте с последующей гомогенизацией в охлажденном этаноле приводит к значительным потерям ИУК, так как холодный этанол не инактивирует многие ферменты. При этом на выход ИУК влияет продолжительность экстракции. Сокращение времени экстракции до 1—1,5 ч, проведение процедур гомогенизации и экстракции в атмосфере азота с добавлением в растворы антиоксидантов позволяет существенно уменьшить разрушение ИУК и увеличить выход ИУК до 60—80 %. Считается, что лучшим инактиватором ферментной деятельности является метанол. Выход ИУК при экстракции из гомогенизированной замороженной ткани холодным метанолом достаточно высок — 97 %, кипящим — 93 %. Поэтому некоторые исследователи (например, Кутачек, Прохазки) предлагают кратковременную фиксацию (1—3 мин) в кипящем метаноле, после чего экстракцию холодным растворителем. При таком способе фиксации одновременно идет экстракция гормона.

При выделении ауксинов из оводненных тканей используют смешивающиеся с водой органические растворители (метанол, этанол, ацетон и др.), а из высушенных тканей — этилацетат, серный эфир, хлороформ. Если стоит задача извлечь только свободную ИУК, то используют оводненный подкисленный серный эфир. Экстракция этим растворителем имеет то преимущество, что он позволяет извлечь из тканей сравнительно небольшую группу соединений и отгоняется при низкой температуре. При экстракции лиофилизированного материала серным эфиром добавляются

инактиваторы ферментов (диэтилдитиокарбамат натрия, метабисульфит натрия и др.). Эфир в обязательном порядке следует освобождать от перекисей. Помимо ИУК оводненный серный эфир извлекает индолилацетамид, индолил-ацетонитрил, триптамин, а также абсцизовую кислоту, фенолкарбоновые кислоты, халконы и другие соединения. Если ставится задача извлечь все индольные и полифенольные продукты (за исключением прочно связанных с белками и другими полимерами), то должен использоваться более полярный растворитель — 70%-й метанол или этанол. Метанол экстрагирует связанные формы индолов без их разрушения. В этом случае удастся экстрагировать индолил-гликозиды, флавонол-гликозиды, гликозиды фенолкарбоновых кислот и др.

Абсцизовая кислота представляет собой оптически активный сесквитерпеноид. Она может существовать в двух стереоизомерных (энантиомерных) формах, так как содержит один асимметрически замещенный атом углерода в кольце (1'): в форме *S*-(+)-энантиомера (правовращающей) и в форме *R*-(-)-энантиомера (левовращающей). Растения содержат преимущественно *S*-(+)-АБК, хотя биологическая (ингибирующая) активность *R*- и *S*-форм одинакова. Синтетическая АБК — это рацемическая смесь равных количеств право- и левовращающих форм — ( $\pm$ )-АБК. Природный изомер (+)-АБК обладает предельно высокой оптической активностью: амплитуда кривой дисперсии оптического вращения составляет  $+24\,000^\circ$  (при длине волны 289 нм) и  $-69\,000^\circ$  (при 246 нм). Это свойство используют для определения малых количеств АБК в тканях методом ДОВ (дисперсия оптического вращения).

Помимо оптической молекула АБК проявляет также и геометрическую изомерию по двойной связи С-2 — С-3 в боковой цепи. Боковая цепь при С-2 может находиться в *цис*- и *транс*-положении. Наиболее распространенная в растениях природная форма АБК имеет 2-*цис*,4-*транс*-конфигурацию боковой цепи, и ее называют просто *цис*-АБК, а 2-*транс*,4-*транс*-изомер называют *транс*-АБК. Под

действием видимого и УФ-света природная форма медленно, без участия ферментов изомеризуется в 2-*транс*-форму с очень низкой биологической активностью, и в растворе устанавливается соотношение *цис*-АБК и *транс*-АБК 1:1. Абсцизовая кислота поглощает УФ, причем максимум меняется с изменением рН раствора: при рН ниже 7 УФ-спектр с максимумом при 262 нм и плечом при 240 нм, в водных растворах с рН = 7 и более максимум поглощения находится при 245 нм.

Химически чистая S-(+)-АБК имеет температуру плавления +160 °С. Это слабая органическая кислота, хорошо растворима в щелочах и органических растворителях (хлороформ, ацетон, метанол, этанол, диэтиловый эфир, этилацетат), плохо — в воде, бензоле, петролейном эфире, гексане.

Не существует единого универсального метода фиксации и извлечения АБК из растительных тканей. Фиксация растительного материала жидким азотом с последующим лиофильным высушиванием позволяет, как и при определении ИУК, наиболее полно сохранить гормон от разрушения. Лиофилизированный материал хранят над хлористым кальцием при +2...+4 °С, а зафиксированный жидким азотом — при температуре –30...–80 °С или на сухом льду. Однако, если условия не позволяют фиксировать материал этим способом, то можно проводить фиксацию в термостате при +105 °С, так как АБК термостабильна. Затем материал досушивают при +60 °С до воздушно-сухого состояния. Этот вариант менее желателен. Некоторые исследователи предпочитают одновременную фиксацию и экстракцию свежего растительного материала в кипящем метаноле или этаноле, если нет необходимости в его хранении.

Существует достаточно много приемов экстракции растительного материала при анализе АБК. Обычно применяют этиловый или метиловый спирт, ацетон. Лучшим экстрагентом является метанол. Но если вести экстракцию в щелочных условиях, то возможно образование

метилового эфира АБК в результате трансметилирования после щелочного гидролиза глюкозного эфира АБК. Проведение экстракции метанолом в кислой среде или ацетонном устраняет подобный эффект. При проведении всех аналитических процедур желательно предохранение образца от действия света, который способствует частичной изомеризации (+)-*цис*-АБК и образованию *транс*-формы АБК. Как и в случае определения ИУК, дальнейшее фракционирование водного остатка, полученного после упаривания спиртового экстракта, чаще всего осуществляют путем разделения с диэтиловым эфиром. Для удаления нейтральных и основных веществ, слабых кислот используют бикарбонатную очистку: перевод экстракта в раствор бикарбоната натрия и очистка диэтиловым эфиром с последующим подкислением экстракта и переводом в эфир кислых соединений — ИУК и АБК.

Дальнейшая очистка гормонов зависит от того, какой метод количественного анализа будет применен. В любом случае необходимо определение потерь гормона на каждом этапе анализа, начиная с первых этапов очистки (фиксация, экстракция, фракционирование) и при всех дальнейших процедурах выделения (разные способы хроматографирования и др.). Для этого используют внутренние стандарты — соединения, близкие по своим физико-химическим свойствам к данному гормону и не встречающиеся в растении. Чаще всего применяют меченый  $C^{14}$ - или  $H^3$ -гормон, а также другие стандарты, специфичные для конкретного метода анализа.

## **Количественные методы определения фитогормонов**

Количество гормона в конечном растворе определяют либо с помощью биотестов, либо физико-химическими методами, основанными на той или иной физико-химической характеристике гормона. Исторически первыми методами анализа фитогормонов были биотесты. Они основаны на

применении изолированных клеток, тканей или органов, лишенных собственного гормона или имеющих очень низкое его содержание, а также обладающих высокой чувствительностью к экзогенному гормону. Величина физиологического ответа таких растительных объектов на экзогенный гормон зависит от количества введенного гормона, она пропорциональна в определенных пределах логарифму его концентрации в растворе. Приводя в контакт с растительной тест-системой анализируемый раствор, содержащий эндогенный гормон, и стандартный раствор гормона и сравнивая величину физиологического ответа данной тест-системы, можно оценить количество гормона в анализируемом образце. Для этого метода характерна высокая избирательность, которая основана на специфичности узнавания гормонов соответствующими рецепторами. Благодаря этому именно с помощью биотестов были открыты фитогормоны в растениях и установлено присутствие в растительных экстрактах цитокининов, гиббереллинов, ИУК и АБК. Только позднее они были идентифицированы с помощью физико-химических методов. Например, специфические и чувствительные биотесты для определения ИУК основаны на способности ауксина стимулировать удлинение отрезков coleoptилей этиолированных проростков пшеницы или овса; для цитокининов — на активации этим гормоном деления клеток в каллусах и суспензионной культуре клеток или на активации биосинтеза бетацианина в проростках щирьцы и др. Для АБК используются такие высокоспецифичные биотесты, как ингибирование роста отрезков coleoptилей или мезокотилей овса; подавление прорастания семян горчицы, изолированных зародышей ячменя; стимуляция закрывания устьиц; ускорение старения изолированных листьев и др. Специфичность биотестов позволяет снизить степень очистки растительного экстракта по сравнению с тем, что требуют физико-химические методы. Обычно очистка образца ограничивается удалением ингибиторов данного физиологического ответа. Но при этом нужно учитывать, что некоторые пары фитогормонов на

отдельные процессы оказывают противоположное действие. Например, ИУК стимулирует, а АБК подавляет удлинение отрезков колеоптилей; цитокинины задерживают старение изолированных листьев, АБК — ускоряет; АБК способствует закрыванию, а цитокинины — открыванию устьиц. Если используются эти биотесты, то перед их проведением нужно отделить ИУК и АБК, а также цитокинины и АБК.

Биотесты широко применяются, они не потеряли своей актуальности и в настоящее время. Система биотестов является единственным критерием для оценки гормональной активности природных соединений. Тесты необходимы для первичного скрининга синтетических аналогов фитогормонов, для подтверждения наличия гормона в ткани перед физико-химическим анализом. Однако необходимо иметь в виду, что они не обладают абсолютной специфичностью. Кроме того, реакция на гормон в биотесте зависит не только от истинной активности соединения, но и от способности гормона проникать в клетки и от быстрой его инактивации в клетках. Поэтому надежность выводов повышается при использовании одновременно различных биотестов. Многие биотесты являются очень трудоемкими, занимающими много времени. Результаты биотестов порой плохо воспроизводимы, что объясняется, очевидно, сложностью биологических систем, с трудом поддающихся факторостатированию для получения стандартизованного ответа. Недостаток всех биологических методов заключается также в том, что они дают в лучшем случае полуколичественную оценку содержания гормона.

Наиболее точное количественное определение гормонов дают физико-химические методы анализа. Большинство используемых методов объединяет хроматографию высокой степени разрешения с детекцией, обеспечивающей селективность. Например, высокоэффективная жидкостная (ВЭЖХ) или капиллярная газовая хроматография (ГХ) в сочетании с детектором электронного захвата,

пламенно-ионизационным или азотно-фосфорным детектором. Абсолютно достоверными являются методы, сочетающие ВЭЖХ и ГХ с масс-спектрометрией (МС) — ГХ—МС и ВЭЖХ—МС. Они обладают большой точностью и избирательностью и незаменимы в тех случаях, когда необходимо строго идентифицировать новое вещество с гормональной активностью или его метаболиты. Но подготовка растительного материала к анализу физико-химическими методами является еще более длительной и трудоемкой процедурой, чем при биотестировании, так как требуется тщательная предварительная очистка образца и используемых реактивов. Например, ВЭЖХ входит почти во все схемы физико-химического анализа фитогормонов как непрерывная стадия разделения групп фитогормонов. Несмотря на несомненные достоинства этих методов, они неприемлемы при оперативном контроле за содержанием фитогормонов в большом количестве образцов или при оценке количества гормона в динамике. Кроме того, требуются большие навески растительного материала, что в некоторых случаях невыполнимо (пыльца, пыльники, семена некоторых видов и т. д.), а также специальное дорогостоящее оборудование и инженерное обеспечение.

Альтернативой вышеописанным методам могут служить иммунохимические методы анализа фитогормонов, которые приобретают все большую популярность. Они сочетают в себе высокую чувствительность (можно определить вещества в концентрации 10—100 пг/мл) и исключительно высокую избирательность, которая обусловлена специфичностью процесса, составляющего принцип самого метода. Высокая избирательность — одно из важных преимуществ иммунохимических методов перед другими. Они обладают относительной простотой, что позволяет одновременно анализировать несколько десятков образцов; не требуют больших навесок растительного материала и сложной длительной очистки экстракта, а также серьезного оборудования, как при использовании физико-химических методов.



## Особенности иммунохимии фитогормонов

В основе всех иммунохимических методов лежит взаимодействие между антигенами (чужеродными для организма веществами) и специфическими антителами, которые вырабатываются лимфоцитами в организме животного в ответ на введение антигена. Так как антитела (АТ) вырабатываются на введение определенного антигена (АГ), то они «узнают» антиген, специфично и количественно взаимодействуя с ним и образуя комплекс антиген — антитело (АГ—АТ). Специфическое связывание антигена с антителами происходит независимо от того, находится антиген в чистом виде или в смеси с какими-либо сопутствующими веществами. Именно этим привлекательны иммунохимические методы, так как они не требуют абсолютной очистки растительных экстрактов при выделении фитогормона. Разные варианты иммунохимических методов отличаются друг от друга в основном тем, каким способом отделяют комплекс АГ—АТ от непрореагировавших компонентов (несвязавшихся антител и антигенов) и как оценивают количество комплекса (следовательно, и количество антигена).

Антигены — вещества различной химической природы: белковой, поли- и олигосахаридной, гликопротеидной, гликолипидной. В молекуле антигена выделяют: а) несущую (основную) часть; б) небольшие участки, определяющие чужеродность антигена, — антигенные детерминанты. Их может быть несколько, что определяет валентность антигена. По химической природе антигенные детерминанты разделяют на три группы:

1. Пептидные — свойственны антигенам белковой природы.
2. Олигосахаридные — свойственны многим антигенам (полисахаридной, гликопротеидной и гликолипидной природы), прежде всего микробным антигенам.
3. Гаптены — имеют одну антигенную детерминанту, т. е. не могут присоединять несколько антител. Это отно-

сительно низкомолекулярные соединения. Гаптены отличаются от полноценных антигенов по некоторым свойствам:

а) в свободном виде не способны вызывать иммунный ответ;

б) соединенные с высокомолекулярным носителем (белком) и образуя конъюгат, вызывают иммунный ответ;

в) реагируют с антителами, полученными при иммунизации животного конъюгатом;

г) способны конкурировать за антитела с конъюгатом белок-гаптен.

Фитогормоны, как антигены, являются гаптенами, так как введенные животным сами по себе не способны вызывать выработку антител. Чтобы у фитогормонов появилась способность вызывать образование антител, необходимо фитогормон связать с белком-носителем и получить конъюгат гормон-белок. Для этого используют разные способы конъюгации гормона с белком, что зависит от присутствия в молекуле гормона функциональных радикалов, например,  $-\text{COOH}$ ,  $-\text{NH}_2$  и других групп. Довольно простым и удобным является карбодиимидный метод — образование ковалентной связи между веществами, имеющими карбоксильные и аминокгруппы. Так как карбоксильная группа имеется у ИУК, АБК и гиббереллинов, то этот способ получения конъюгата широко используется. Для получения конъюгатов цитокининов обычно применяют их рибозилированные производные.

Для получения сыворотки со специфическими антителами к гормону конъюгат гормон-белок вводят животному (обычно кроликам или другим животным). Через 2—3 месяца в крови появляются антитела к введенному конъюгату. Однако сыворотка содержит антитела не только к гормону, но и к белку-носителю. Чтобы антитела к белку-носителю не мешали обнаружению антител к гормону, нужно их разделить. Для этого к сыворотке добавляют новый конъюгат гормон-белок с другим белком-носителем. Имеющиеся в сыворотке антитела к гормону будут

взаимодействовать с гормоном нового конъюгата, а антитела к белку не будут связываться с новым белком-носителем в конъюгате, так как они были выработаны к белку первого конъюгата (рис. 1).

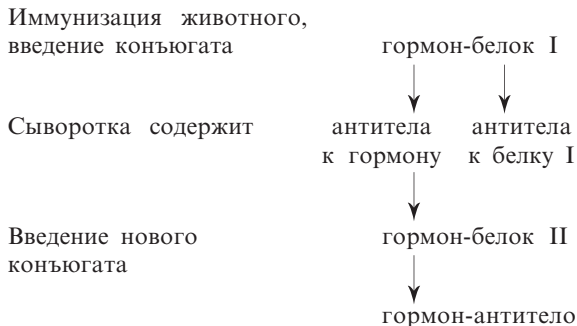


Рис. 1

Образовавшийся комплекс гормон-антитело нужно отделить от других антител и определить количество антител к гормону в сыворотке. Применяют разные методы, в том числе меченый радиоактивный гормон.

После того как получена сыворотка со специфическими антителами к соответствующему гормону и определена их концентрация в сыворотке, ее используют для определения содержания фитогормона в растениях. При определении фитогормонов не столь важно, какие используются антитела — поли- или моноклональные, так как молекула фитогормона мала и имеет, очевидно, лишь одну антигенную детерминанту. Это не оказывает существенного влияния также на выбор варианта иммунохимического анализа фитогормонов.

Традиционные иммунохимические методы, основанные на образовании преципитата комплекса АГ—АТ, не применимы для определения фитогормонов (например, реакция радиальной диффузии, реакция двойной иммунодиффузии и др.). Они применимы для определения антигенов, имеющих несколько антигенных детерминант и, соответственно, способных связывать несколько антител, которые, в свою

очередь, связываются с новыми антигенами и т. д. В результате образуется преципитат, который достаточно легко определяется. Фитогормоны, как гаптены, не способны образовывать с антителами преципитаты. Поэтому для определения фитогормонов используют в основном конкурентные варианты иммуноанализа. В этих случаях для увеличения чувствительности метода в один из компонентов системы (в АГ или АТ) вводят маркер. Маркером может служить радиоактивный изотоп (например,  $H^3$  или  $J^{125}$ ) — это вариант радиоиммунного анализа (РИА). Если маркером является фермент (например, пероксидаза или щелочная фосфатаза), осуществляющий цветную реакцию, то метод называется иммуноферментный (ИФА). О количестве связавшихся молекул антигена с антителами судят по изменению окраски в цветной реакции, катализируемой ферментом. Методы РИА и ИФА имеют приблизительно одинаковую специфичность и чувствительность, но ИФА имеет ряд преимуществ перед РИА: большая стабильность конъюгата антигена или антитела с меткой; безопасность и простота исполнения; отсутствие необходимости дорогостоящего оборудования. Поэтому ИФА наиболее распространен.

Принцип конкурентного анализа состоит в том, что существует конкуренция между меченым антигеном (АГ\*) и немеченым антигеном (АГ) за ограниченное количество сайтов связывания антител — немеченый антиген подавляет связывание меченого антигена с антителом (рис. 2).

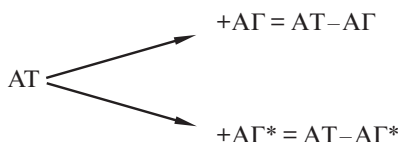


Рис. 2

Если концентрация АТ и АГ\* в системе сохраняется постоянной, то доля метки, связанной с антителом (кон-

центрация комплекса АТ–АГ\*), будет обратно пропорциональна концентрации немеченого АГ.

Конкурентные варианты иммуноанализа фитогормонов различаются тем, с каким из компонентов реакции (с АГ или АТ) связана метка. Они требуют разделения непрореагировавших иммунореагентов (меченого антигена или меченого антитела) от образовавшегося меченого комплекса АТ–АГ. Очень удобным способом отделения несвязавшихся иммунореагентов является твердофазный иммуноанализ. Один из иммунореагентов (АТ или АГ) сорбируется на твердой фазе (например, полистироловый планшет). Этот процесс называется *сенсibilизация*. Связывание на полистироле чаще нековалентное, осуществляется за счет гидрофобного взаимодействия. Чтобы в лунках полистиролового планшета не было оставшихся мест связывания, добавляют избыточное количество балластного белка (сывороточный альбумин). В результате твердая фаза превращается в иммуносорбент, который может специфически связывать лишь те компоненты, которые структурно ему соответствуют: если на полистироловом планшете сорбированы антитела, то связываются на твердой фазе антигены и наоборот. В конкурентных вариантах иммуноанализа фитогормонов на полистироле сорбируются антитела, так как фитогормоны, являясь гаптенами, сами по себе на полистироле не сорбируются. Если сорбция происходит, то фитогормоны теряют способность связывать антитела.

Для определения фитогормонов используют два варианта твердофазного конкурентного иммуноферментного анализа (ТФИФА). Первый состоит в том, что на полистироле сорбированы АТ. Затем в лунки планшета вносят меченный ферментом гормон (конъюгат ФГ-фермент) и немеченый гормон, содержащийся в исследуемом образце. За счет конкуренции немеченый гормон подавляет связывание меченого ферментом фитогормона с антителами. Следовательно, чем выше концентрация свободного гормона в образце, тем меньше фермента сорбируется на полистироле и сильнее ингибируется ферментативная цветная реакция. Это прямой вариант ТФИФА (рис. 3).

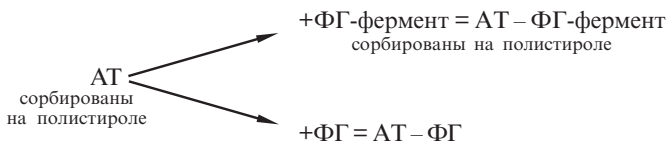


Рис. 3

В другом варианте ТФИФА метка связывается не с фитогормоном, а с антителами. Также происходит конкуренция за антитела между свободным гормоном исследуемого образца и гормоном, который конъюгирован с белком (конъюгат ФГ-белок) и сорбирован на полистироле. Это непрямой вариант ТФИФА (рис. 4).

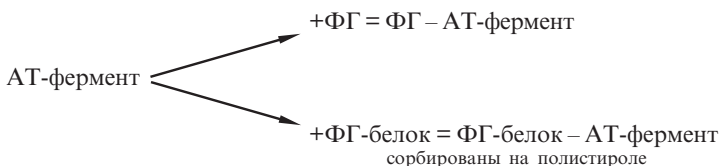


Рис. 4

Чем выше концентрация свободного фитогормона в исследуемом образце, тем меньше меченных ферментом антител будет связываться с конъюгатом ФГ-белок, сорбированным на твердой фазе полистиролового планшета, и тем слабее будет идти цветная реакция.

Используют модификацию непрямого варианта ТФИФА, состоящую в том, что количество антител, сорбируемых на полистироле, определяют с помощью «вторых» антител. В этом случае метка (фермент) связывается не с кроличьими антителами, которые были получены при иммунизации кролика конъюгатом ФГ-белок («первые» антигормональные антитела), а со «вторыми» антителами. Их получают введением «первых» антител кролика какому-либо другому животному, у которого вырабатываются антитела к антигенам кролика. «Вторые» (антивидовые) антитела специфически связываются с «первыми» (рис. 5).

По этому способу на полистироле сорбируется конъюгат ФГ-белок, затем в лунках планшета инкубируется

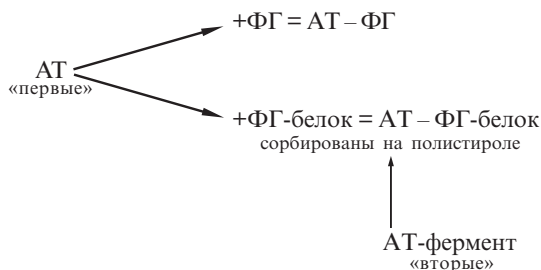


Рис. 5

сыворотка с «первыми» антигормональными антителами и исследуемый образец, содержащий свободный фитогормон. Проявление цветной реакции осуществляется с помощью внесения в лунки конъюгата «вторых» антивидовых анти-тел с пероксидазой, которые специфически связываются с «первыми» антителами на твердой фазе.

Введение дополнительной стадии анализа (обработка «вторыми» антителами) компенсируется рядом преимуществ. Фитогормоны связываются в этом случае не с ферментом, а просто с белком. Поэтому уменьшается опасность снижения ферментативной активности, неизбежная при всяком конъюгировании фермента. «Пришивка» фермента к антителам достаточно отлаженная процедура. Однако, если метить ферментом «первые» антигормональные антитела, то их нужно хорошо очистить. Если использовать меченые антивидовые («вторые») антитела, то очистка антигормональной сыворотки не требуется, так как специфические антитела к гормону связываются с конъюгатом ФГ-белок на твердой фазе из любой смеси антител. Фактически иммуносорбент, сенсibilизированный конъюгатом ФГ-белок, осуществляет очистку специфических антигормональных антител. В связи с этим при использовании «вторых» антител достаточно просто отделить антигормональную сыворотку, и она является пригодной для работы.

# ЛАБОРАТОРНЫЕ РАБОТЫ

## Работа 1. Определение содержания абсцизовой и индолилуксусной кислот методом ТФИФА

### 1. Фиксация материала

Замораживание в жидком азоте с последующим лиофильным высушиванием является наиболее щадящим способом фиксации и хранения растительного материала для определения АБК и ИУК. Если такая возможность отсутствует, то можно для определения АБК (но не ИУК!) провести фиксацию в термостате при  $+105^{\circ}\text{C}$  и высушить материал до воздушно-сухого состояния при  $+60^{\circ}\text{C}$ . Хранить при  $+1...+2^{\circ}\text{C}$  (в холодильнике) в эксикаторе с притертой крышкой над прокаленным хлористым кальцием.

### 2. Экстракция

**2.1.** Фиксированный жидким азотом материал гомогенизировать на холоде, поместить в пробирки и залить для экстракции холодным 80%-м этанолом из расчета 10 мл на 1 г сырого веса. На стадии гомогенизации и экстракции необходимо добавить один из антиокислителей (меркаптоэтанол, диэтилдитиокарбамат натрия, метабисульфит натрия и др.). Если материал фиксирован и высушен в термостате для определения только АБК, взять измельченную навеску сухого материала 200—300 мг и залить 15 мл холодного 80%-го этанола. В обоих случаях экстракцию проводить при температуре  $+2...+4^{\circ}\text{C}$  (в холодильнике) в течение 12—16 ч при периодическом встряхивании пробирок. После чего для увеличения и ускорения выхода гормонов из растительной ткани пробирки еще встряхивать на качалке в течение 5—10 мин.

**Внимание!** Гомогенизация, экстракция и все последующие процедуры проводят на рассеянном свете, защищая



образцы от прямого воздействия света, который ускоряет деградацию фитогормонов.

**2.2.** После окончания экстракции содержимое в пробирках перенести количественно в центрифужные пробирки, несколько раз смывая новыми порциями 80%-го этанола пробирки, в которых проводили экстракцию. Центрифугировать на холоде при 13—15 тыс. *g* в течение 5—10 мин. Супернатант слить в маленькие фарфоровые чашки, а осадок растительного материала еще дважды промыть 3—5 мл этанола и центрифугировать, объединив супернатанты с первой порцией. Полученный спиртовой экстракт упарить до водного остатка в токе холодного воздуха. Для этой цели можно использовать вентилятор «Ветерок» в положении «Холод». Объем водного остатка после выпаривания этанола должен составлять не более 3,5—4,0 мл. Последующее выделение АБК и ИУК из водного остатка и определение их содержания с помощью ТФИФА проводится по схемам с использованием иммуноферментных тест-систем, разработанных Г. Р. Кудояровой, С. Ю. Веселовым с сотр. (1990; 1994; 1998).

**2.3.** Схема экстракции и концентрирования АБК и ИУК из водного остатка включает уменьшение объемов растворителей на каждом этапе. Водный остаток довести водой до 10—12 мл, подкислить 1 *N* соляной кислотой до  $\text{pH} = 2\text{—}3$  (несколько капель, важно не переокислить, так как возможна деградация гормонов). Подкисленный водный остаток перенести в мерные цилиндры с притертой пробкой, довести объем водой до 15 мл и провести экстракцию очищенным от перекисей, подкисленным диэтиловым эфиром. Для этого добавить 5 мл эфира, закрыть пробкой и осторожно перемешивать водный остаток и эфир покачиванием цилиндра. После разделения фаз эфир собрать пипеткой (он сверху) и перенести в чистые пробирки. Операцию повторить, добавив к водному остатку 3 мл эфира. Обе эфирные фракции, где содержатся свободные ИУК и АБК, объединить, а водный остаток отбросить, если он не используется для определения связанных форм гормонов.

**2.4.** К эфирному экстракту добавить 4 мл 1%-го раствора бикарбоната натрия, перемешать осторожным покачиванием и, дождавшись разделения фаз, эфир собрать и отбросить. При этом ИУК и АБК находятся в растворе бикарбоната, а вместе с эфиром удаляются нейтральные производные гормонов, которые могут мешать определению свободных форм при иммуноанализе. Оставшуюся фракцию соды подкислить 1 *N* соляной кислотой до pH = 2—3 (0,3—0,4 мл) и дважды экстрагировать гормоны из раствора соды диэтиловым эфиром, добавляя каждый раз по 2 мл эфира. После перемешивания и разделения фаз эфирную фракцию собрать и поместить в маленькие (лучше «пальчиковые») пробирки. Объединенный эфирный экстракт выпаривать в пробирках под током холодного воздуха.

**2.5.** Сухой остаток на дне пробирки, содержащий ИУК и АБК, сразу метилировать диазометаном и использовать для иммуноанализа либо ИУК, либо АБК. В случае определения АБК метилирование не обязательно.

Описанная схема экстракционной очистки, основанная на уменьшении объема экстрагента на каждой стадии экстракции и реэкстракции, обеспечивает довольно высокий выход ИУК и АБК. В то же время уменьшает выход иммунореактивных предшественников ИУК (индолилацетальдегид, индолилацетонитрил), а также позволяет освободиться от основной массы интерферирующих иммунореактивных компонентов. Вторичный эфирный экстракт содержит в основном главные иммунореактивные компоненты — ИУК и АБК. Такой очистки достаточно для определения ИУК и АБК методом ТФИФА благодаря высокой специфичности, чувствительности и избирательности применяемых иммуноферментных тест-систем. В данной работе для проведения модифицированного непрямого варианта ТФИФА используются тест-системы, производимые НПО «Фармхиминвест» (г. Уфа). Набор иммунореагентов включает: конъюгат фитогормон-белок (ФГ-белок); конъюгат антивидовых антител с пероксидазой, это «вторые» баряни антитела, полученные против иммуноглобулинов кролика

и меченные пероксидазой — антивидовой пероксидазный конъюгат (АТ-фермент); антигормональная сыворотка, содержащая «первые» кроличьи антитела к соответствующему гормону (АТ); балластный белок – сывороточный альбумин.

### 3. Проведение ТФИФА

Для проведения ТФИФА применяют полистироловые планшеты фирм «Linbro», «NUNC», «Енисей», которые могут различаться особенностью химической структуры твердой фазы и сорбционной емкостью. По данным С. Ю. Веселова (1998), это важно учитывать при использовании тест-систем в прямом ТФИФА, когда на планшете сорбируются антитела. При непрямом ТФИФА, в котором на планшете сенсibiliзируется конъюгат ФГ-белок с высокой плотностью связывающих центров (например, 10 молекул гормона на 1 молекулу белка), сорбционная емкость планшетов указанных фирм является, как правило, достаточной.

На рис. 6 показано расположение лунок на полистироловом планшете: 12 вертикальных рядов по 8 лунок в каждом. Всего 96 лунок объемом по 200 мкл, т. е. одновременно можно проводить иммуноанализ по определению фитогормонов в нескольких образцах. Один или два ряда лунок используют для построения калибровочной кривой

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1	О	О	О	О	О	О	О	О	О	О	О	О
2	О	О	О	О	О	О	О	О	О	О	О	О
3	О	О	О	О	О	О	О	О	О	О	О	О
4	О	О	О	О	О	О	О	О	О	О	О	О
5	О	О	О	О	О	О	О	О	О	О	О	О
6	О	О	О	О	О	О	О	О	О	О	О	О
7	О	О	О	О	О	О	О	О	О	О	О	О
8	О	О	О	О	О	О	О	О	О	О	О	О

Рис. 6. Расположение лунок на полистироловом планшете

стандартного фитогормона. Крайние лунки желательно не использовать, так как они могут отличаться от других сорбционной способностью.

### **3.1. Сенсибилизация**

3.1.1. Содержимое флакона или ампулы с конъюгатом ФГ-белок (ИУК-белок или АБК-белок) растворить в объеме бидистиллированной воды, указанном на этикетке флакона.

3.1.2. Приготовить рабочее разведение конъюгата на карбонатном буфере  $\text{pH} = 9,2$  в указанном соотношении, например, 1:100 или 1:200. Возможно разведение конъюгата в карбонатном буферном растворе без предварительного растворения водой, о чем сообщается на этикетке набора.

**Внимание!** Следите за рекомендациями по разведению. Рабочий раствор конъюгата ФГ-белок следует использовать только в день приготовления. Рассчитывается его необходимое количество в зависимости от числа исследуемых образцов и лунок планшета, используемых для иммуноанализа каждого опытного образца и калибровочной кривой стандартного гормона из расчета 200 мкл на 1 лунку. Иммуноанализ одного образца обычно проводится в 4—8 лунках.

3.1.3. Внести в лунки планшета по 200 мкл приготовленного раствора конъюгата ФГ-белок на карбонатном буфере. Планшет закрыть крышкой и выдержать 1,5—2 ч при температуре  $+37\text{ }^{\circ}\text{C}$  в термостате или 16—20 ч при температуре  $+2...+4\text{ }^{\circ}\text{C}$  в холодильнике для адсорбции (сенсибилизации) конъюгата ФГ-белок на твердой фазе планшета.

3.1.4. После завершения этапа адсорбции раствор конъюгата удалить из лунок встряхиванием перевернутого планшета и промыть лунки три раза раствором фосфатно-солевого буфера ( $\text{pH} = 7,2 \pm 0,2$ ), содержащего 0,05 % Твин 20 (раствор «ФТ»). При последнем промывании остатки промывной жидкости тщательно удалить из лунок многократным встряхиванием планшета.

### **3.2. Реакция с антителами**

3.2.1. После промывания в лунки внести по 90 мкл фосфатно-солевого буферного раствора, содержащего 0,25—0,5 % альбумина (раствор «ФТБ»).

3.2.2. В шести или семи лунках первого и/или второго ряда планшета приготовить десятикратные разведения стандартного раствора гормона (ИУК или АБК) для построения калибровочной кривой. Для этого в первую или вторую лунку ряда внести 10 мкл исходного стандартного раствора гормона в концентрации 1 мг/мл. Перемешать и, сменив наконечник дозатора, взять из полученного раствора этой лунки 10 мкл и перенести в следующую лунку. Повторяя операцию, приготовить таким образом разведения стандартного раствора в пяти или шести лунках, в которых содержание гормона уменьшается от 10 мкг до 100 или 10 пг. В последние лунки ряда раствор гормона не вносить — это бесконкурентный вариант; оптическая плотность раствора в этих лунках после проведения иммуноферментной реакции принимается за нулевую точку.

3.2.3. В другие рабочие лунки планшета (кроме лунок калибровочного ряда) внести по 10 мкл спиртового раствора экстрактов опытных образцов (4—8 лунок для каждого образца). Предварительно растворить сухие остатки растительных экстрактов, находящихся в «пальчиковых» пробирках, в 100 мкл 80%-го этанола, перемешивая содержимое осторожным поворотом пробирки. В лунки калибровочной кривой, содержащие стандартные растворы гормона, и в лунки бесконкурентного варианта внести по 10 мкл 80%-го этанола для выравнивания сорбционных условий во всех лунках. Стандартный раствор ИУК, используемый для построения калибровочной кривой, **обязательно** метилируется, как и сухие экстракты опытных образцов при определении в них данного гормона. В случае определения АБК метилирование стандартного раствора и экстрактов опытных образцов возможно, но не обязательно.

3.2.4. Содержимое флакона с антисывороткой к соответствующему гормону (к ИУК или АБК) растворить в бидистиллированной воде, как указано на этикетке флакона. Затем приготовить рабочее разведение антисыворотки на растворе «ФТБ» в указанном соотношении, предварительно рассчитав необходимый объем сыворотки

в соответствии с числом рабочих лунок на планшете (100 мкл сыворотки на 1 лунку).

3.2.5. Во все рабочие лунки, включая лунки калибровочного ряда и бесконкурентного варианта, внести по 100 мкл приготовленного раствора антисыворотки к гормону на «ФТБ». Планшет закрыть крышкой и выдержать в термостате при  $+37^{\circ}\text{C}$  2 ч. При определении ИУК время выдерживания планшета в термостате может быть сокращено до 1—1,5 ч.

3.2.6. После термостатирования содержимое из лунок удалить встряхиванием перевернутого планшета. Промыть три раза раствором «ФТ», полностью заполняя лунки планшета промывным раствором. В конце промывания тщательно освободить лунки от остатков жидкости.

### **3.3. Посадка пероксидазы**

3.3.1. Содержимое флакона с антивидовым пероксидазным конъюгатом растворить в бидистиллированной воде в указанном объеме. Приготовить рабочее разведение пероксидазного конъюгата на растворе «ФТБ» согласно рекомендации производителя. В наборе иммунореагентов пероксидазный конъюгат может быть в отдельном флаконе для определения каждого гормона либо общий для всех фитогормонов в одном флаконе, но рабочее разведение для каждого из них разное, которое указывается на этикетке набора. Так же как и другие иммунореагенты, раствор антивидового пероксидазного конъюгата на «ФТБ» готовят в необходимом объеме в соответствии с числом рабочих лунок на планшете из расчета 200 мкл на 1 лунку.

3.3.2. Во все рабочие лунки планшета внести по 200 мкл раствора антивидового пероксидазного конъюгата на «ФТБ». Планшет закрыть крышкой и выдержать в термостате при  $+37^{\circ}\text{C}$  в течение 1—1,5 ч.

3.3.3. После термостатирования жидкость из лунок удалить и промыть лунки трижды раствором «ФТ», аккуратно освободив их от остатков промывного раствора (см. п. 3.1.4 и 3.2.6).

### **3.4. Цветная реакция**

3.4.1. Приготовить раствор субстрата непосредственно перед проведением цветной реакции. Он включает 0,04 % ортофенилендиамина и 0,01 % перекиси водорода в 0,6 М цитратно-фосфатном буфере  $\text{pH} = 5,1 \pm 0,1$ . Для этого к 25 мл указанного буфера добавить 10 мг ортофенилендиамина и 10 мкл 30%-й перекиси водорода. Исходя из этого соотношения компонентов, приготовить необходимый объем субстратного буферного раствора с учетом количества рабочих лунок на планшете (200 мкл на 1 лунку). Взять необходимую навеску ортофенилендиамина на кальке и вместе с калькой поместить в стакан, обернутый темной бумагой. Прилить соответствующее количество фосфатно-цитратного буфера и 30%-й перекиси водорода, тщательно перемешать.

3.4.2. Быстро внести в рабочие лунки по 200 мкл субстратного буферного раствора и, закрыв планшет крышкой и темной бумагой, выдержать при комнатной температуре 20—25 °С в течение 10—15 мин (иногда до 20 мин в зависимости от скорости протекания ферментативной реакции).

3.4.3. Реакцию остановить в момент достижения наиболее ярких различий окраски в лунках калибровочного ряда с разным содержанием стандартного гормона, добавив по 50 мкл в каждую лунку разбавленной 1:1 серной кислоты.

**Внимание!** На всех этапах иммуноанализа не следует держать лунки планшета без жидкости долгое время.

3.4.4. Измерить оптическую плотность раствора в лунках после фиксации серной кислотой на спектрофотометре при длине волны 492 нм против бидистиллированной воды в той последовательности, в какой вносили в лунки все иммунореагенты при проведении ТФИФА. Использовать микрокуветы.

### **3.5. Определение количества гормона в образце**

3.5.1. Построить калибровочную кривую зависимости оптической плотности растворов от десятичного логарифма

концентрации стандартного гормона в лунках. Калибровочная кривая имеет сигмоидную форму (рис. 7). Линейная область кривой совпадает с диапазоном наиболее точных измерений, где ошибка определения минимальна, поскольку в этой области большей разнице в оптической плотности соответствует меньшее отклонение в содержании гормона, чем в нелинейных областях. Чем выше угол наклона линейной области, тем выше точность измерений. Параметры

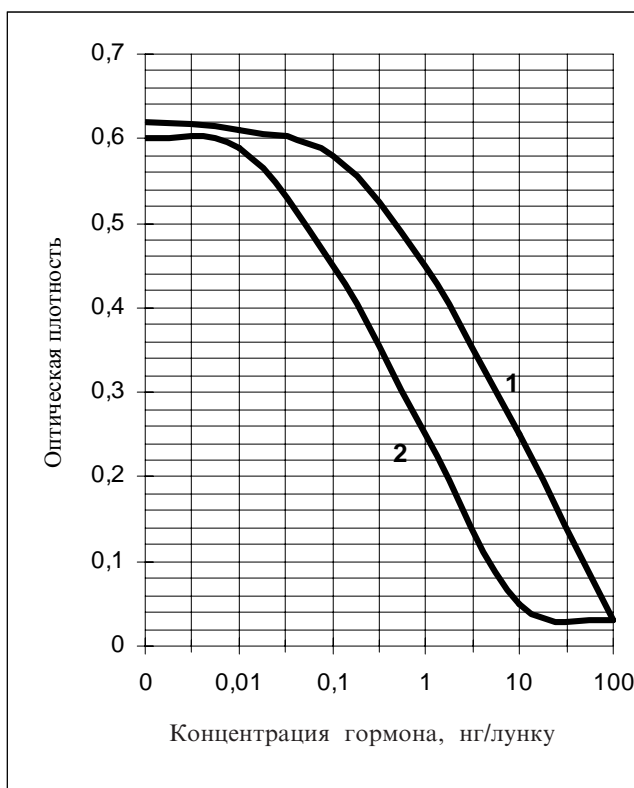


Рис. 7. Зависимость параметров концентрационной кривой от разведения сыворотки или конъюгата ФГ-белок:

1 — высокая концентрация иммуореагента; 2 — разведение иммуореагента в два раза



концентрационной кривой зависят от разведения сыворотки, конъюгата ФГ-белок, метилирования гормона (особенно ИУК). Уменьшение концентрации сыворотки приводит к сдвигу верхнего предела линейной области в сторону меньших концентраций гормона. Нижний предел линейной области также сдвигается, но в меньшей степени. В результате увеличивается наклон линейной области (если концентрация конъюгата ФГ-белок является лимитирующей) и, следовательно, точность измерений, но уменьшается диапазон концентраций в линейной области. Такое же изменение параметров концентрационной кривой происходит при уменьшении концентрации конъюгата ФГ-белок, который сорбируется на полистироле. Хотя при снижении концентрации иммунореагентов увеличивается чувствительность реакции, тем не менее снижение концентрации имеет свои пределы, так как при очень сильном разведении иммунореагентов уменьшается наклон линейного участка, кривая становится пологой и снижается точность определений.

3.5.2. Определить количество гормона в лунках, куда были внесены экстракты растительных образцов. На калибровочной кривой отметить значение оптической плотности раствора в лунке опытного образца и провести вертикальную линию до пересечения с осью абсцисс (см. рис. 7). Точка пересечения попадет в какой-то интервал концентраций, например, от 1 до 10 нг. Если разбить этот интервал на 10 равных частей, то точка пересечения будет указывать какую-то часть этого интервала (от 0,1 до 0,9). Так как на оси абсцисс увеличение концентрации гормона показано в логарифмической шкале, то для определения истинной концентрации вводятся коэффициенты (табл. 1). Например, при оптической плотности 0,14 (см. рис. 7, кривая 2) точка пересечения с осью абсцисс попадает на 0,5-ю часть интервала концентраций от 1 до 10 нг. При линейном масштабе это соответствовало бы концентрации 6 нг. Фактическая концентрация определяется умножением минимального значения концентрации этого интервала (в данном случае 1 нг) на коэффициент, соответствующий

0,5 части интервала — 3,1 (см. табл. 1), т. е. концентрация гормона в лунке опытного образца равна 3,1 нг.

Таблица 1

**Коэффициенты для определения содержания гормона при логарифмической шкале концентрационной кривой**

Часть концентрационного интервала	Коэффициент	Часть концентрационного интервала	Коэффициент
0,10	1,25	0,55	3,5
0,15	1,40	0,60	4,0
0,20	1,60	0,65	4,5
0,25	1,80	0,70	5,0
0,30	2,00	0,75	5,6
0,35	2,20	0,80	6,3
0,40	2,50	0,85	7,0
0,45	2,80	0,90	7,9
0,50	3,10	0,95	8,9

3.5.3. Рассчитать среднее значение из нескольких определений содержания гормона в лунке и на 1 г сухого веса растительной ткани по формуле:

$$X = C \cdot V_1 / M \cdot V_2,$$

где  $X$  — концентрация гормона на 1 г сухого веса;

$C$  — содержание гормона в лунке, определяемое по калибровочной кривой;

$V_1$  — объем 80%-го этанола, в котором растворяется сухой экстракт образца (как правило, 100 мкл, но может быть изменен);

$V_2$  — объем спиртового экстракта, вносимого в лунку — 10 мкл;

$M$  — сухая масса навески растительного материала, взятой для иммуноанализа.

Если  $V_1 = 100$  мкл и  $V_2 = 10$  мкл (как дано в методике), то концентрация гормона на 1 г сухого веса рассчитывается по формуле:

$$X = 10 \cdot C/M.$$

#### 4. Приготовление растворов

**4.1.** Карбонатный буфер,  $\text{pH} = 9,2 \pm 0,2$ :

$\text{Na}_2\text{CO}_3$  — 3,2 г;

$\text{NaHCO}_3$  — 5,1 г.

Растворить в воде и довести раствор до 1 л.

**4.2.** Фосфатно-солевой буферный раствор с Твин 20 («ФТ»),  $\text{pH} = 7,2 \pm 0,2$ :

раствор А:  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  — 71,6 г, довести до 1 л;

раствор Б:  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  — 27,6 г, довести до 1 л;

буферный раствор: 36 мл раствор А + 14 мл раствор Б + 8,7  $\text{NaCl}$  + 0,5 мл Твин 20, довести до 1 л.

**4.3.** Раствор «ФТБ»: 100 мл раствор «ФТ» + 0,25 г альбумин.

**4.4.** Субстратный буферный раствор для цветной реакции, приготовить непосредственно перед употреблением: 25 мл субстратный буфер ( $\text{pH} = 5,1 \pm 0,1$ ) + 10 мг ортофенилендиамин + 10 мкл 30%-й перекиси водорода.

Субстратный буфер,  $\text{pH} = 5,1 \pm 0,1$ :

раствор А:  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  — 2,1 г на 100 мл воды;

раствор Б: лимонная кислота — 7,7 г на 100 мл воды;

буфер: 90 мл раствор А + 10 мл раствор Б.

**4.5.** Стандартный раствор ИУК или АБК.

Взять навеску 1 мг препарата ИУК или АБК на кальке и вместе с ней навеску перенести в мерную «пальчиковую» пробирку. Добавить 2—3 капли 80%-го этанола, растворить навеску и довести раствор до 1 мл водой. Хранить в морозильной камере.

**Внимание!** Гарантийный срок хранения сухих наборов для иммуноанализа при температуре  $+2...+5$  °С в холодильнике — один год. Водный раствор антисыворотки к гормону можно хранить в течение 5 дней в холодильнике при температуре  $+2...+5$  °С или в течение 30 дней при

температуре  $-20\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}$ . Повторное замораживание — оттаивание препаратов не рекомендуется. При необходимости длительного хранения антисыворотки ее переводят в сульфатный осадок. Для этого добавляют к раствору сыворотки равный объем насыщенного сернокислого аммония и хранят при температуре  $0...+10\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Лиофилизированные препараты конъюгата ФГ-белок и антивидового пероксидазного конъюгата после растворения используются в день постановки опыта и хранению не подлежат. Все растворы готовятся на бидистиллированной воде.

## **5. Очистка диэтилового эфира**

К 1 л эфира добавить 100 мл 20%-го метабисульфита натрия или калия. Встряхивать в делительной воронке, затем дать отстояться до разделения фаз. Находящийся внизу метабисульфит отбросить. Прилить к эфиру 100 мл 20%-го NaOH или KOH и процедуру повторить. После удаления щелочи эфир встряхивать с водой, повторив процедуру 4—5 раз. Эфир поместить в склянку с притертой пробкой и подкислить (10 мл 2%-й HCl на 1 л эфира).

## **6. Получение диазометана**

В коническую колбу на 50—100 мл налить охлажденный 40%-й раствор KOH и диэтиловый эфир,  $\frac{2}{3}$  от объема щелочи (например, если щелочи 30 мл, то эфира взять 20 мл). Быстро перемешать на магнитной мешалке и осторожно на кончике шпателя добавить охлажденную нитрозометилмочевину до появления ярко-желтой окраски эфирной фракции. Содержимое колбы перенести в делительную воронку. После разделения фаз нижний слой, содержащий KOH, слить и загасить добавлением 50%-й уксусной или другой кислоты до его осветления. Оставить на ночь под тягой для удаления остатков эфира и слить в раковину. Верхний слой в делительной воронке — эфир, содержащий диазометан и имеющий ярко-желтый цвет, — сразу использовать для метилирования стандартного гормона и эфирных сухих экстрактов опытных образцов, которые метилируются сразу после их получения.

## **7. Метилирование образцов**

В «пальчиковые» пробирки, на дне которых находятся сухие эфирные экстракты опытных образцов, прилить по 1 мл эфира, содержащего диазометан. Осторожно встряхивать пробирки в течение одной минуты, затем выпарить эфир под током холодного воздуха под тягой. В результате сухой остаток на дне пробирки содержит метилированные ИУК и АБК. Метилированные образцы можно хранить в морозильной камере до проведения ТФИФА. Для метилирования стандартного гормона навеску 1 мг перенести в мерную «пальчиковую» пробирку. Прилить 1 мл эфира, содержащего диазометан, и встряхивать. После выпаривания эфира навеску растворить, как указано выше (см. п. 4.5).

## **Работа 2. Определение содержания цитокининов методом ТФИФА**

### **1. Фиксация материала**

**1.1.** Навеску растительного материала 0,5—2 г фиксировать одним из возможных способов: а) замораживание в жидком азоте с последующим лиофильным высушиванием, если предполагается хранение материала; б) кратковременное кипячение в 80%-м этаноле (или метаноле). При этом навеску поместить на 1—2 мин в стаканчик с кипящим спиртом, который должен полностью закрывать фиксируемый материал. Во время такой фиксации происходит также частичная экстракция цитокининов. Поэтому спирт, в котором фиксировали навеску, нужно количественно перенести в пробирки, куда помещается растительный материал после гомогенизации.

### **2. Экстракция**

**2.1.** Измельченную навеску перенести в пробирки, залить холодным 80%-м этанолом из расчета 10 мл на 1 г

сырого веса (в случае фиксации кипящим спиртом нужно учесть взятый для этого объем). Условия экстракции цитокининов из растительной ткани и процедуры их перевода в водный остаток такие же, как описаны для определения ИУК и АБК (см. п. 2.1 и 2.2 в работе 1).

**2.2.** Спиртовой экстракт упарить в токе теплого воздуха до водного остатка (вентилятор «Ветерок», положение «Тепло»). Довести pH до 7,6—7,8, используя 10—40%-е растворы КОН или NaOH.

**2.3.** Перенести водный остаток в мерные пробирки и экстрагировать цитокинины водонасыщенным бутанолом (в соотношении 1:1 по объему). Пробирки встряхивать в течение 1—2 мин. После разделения фаз бутанольную фракцию осторожно собрать пипеткой (бутанол вверх) и поместить в фарфоровые чашки. Экстракцию повторить еще дважды. Разделение фаз происходит медленно, поэтому нужно обязательно дожидаться полного разделения фаз, чтобы не было промежуточного слоя.

**2.4.** Объединенный бутанольный экстракт выпарить досуха в токе теплого воздуха. Если спиртовой экстракт и водный остаток содержали пигменты, то бутанольный экстракт также становится окрашенным. Присутствие пигментов в бутанольном экстракте мешает проведению иммуноанализа, вызывая неспецифическую интерференцию. Освободиться от пигментов и других гидрофобных примесей можно на разных стадиях анализа: а) водный остаток после процедуры замораживания — оттаивания центрифугировать при 15 тыс. g в течение 10—15 мин; б) в водный остаток, подкисленный до pH = 2—3, прилить равное количество диэтилового эфира, взболтать. При этом пигменты переходят в эфир, который удаляется. Если перед извлечением цитокининов из водного остатка были экстрагированы ИУК или АБК эфиром, то пигменты и гидрофобные примеси удалены из водного остатка с эфирной фракцией. В этом случае бутанольный экстракт, как правило, бесцветен и не требует дополнительной очистки от пигментов и липофильных соединений.

### 3. Проведение ТФИФА

Все процедуры иммуноанализа цитокининов и последовательность их проведения, способ расчета количественного содержания аналогичны таковым при определении ИУК и АБК (см. п. 3.1—4.5 в работе 1). Однако ТФИФА цитокининов имеет некоторые особенности. В водном остатке, полученном после экстракции цитокининов 80%-м этанолом, может присутствовать целый комплекс различных форм цитокининов: зеатин (З), *цис*-зеатин, дигидрозеатин (ДЗ), изопентениладенин (ИП), их рибозиды, риботиды, О- и N-глюкозиды. В зависимости от того, какая тест-система используется для иммуноанализа, т. е. к какому цитокинину получены антитела, в водном или бутанольном экстрактах можно определить разные цитокинины.

В таблице 2 показана специфичность различных тест-систем для определения цитокининов (Веселов, 1998). В тест-системе с антисывороткой к зеатин-рибозиду (ЗР), которая используется в данной лабораторной работе, высокой иммунореактивностью обладают: зеатин-рибозид, зеатин, зеатин-риботид (нуклеотид зеатина) и 9-N-глюкозид. Все остальные цитокинины в этой тест-системе проявляли очень слабую иммунореактивность. Линейная область калибровочной кривой этих соединений сдвигается в область более высоких концентраций по сравнению с зеатин-рибозидом и зеатином, т. е. антисыворотка к зеатин-рибозиду имеет большое сродство именно к производным зеатина.

В тест-системе с антителами к рибозиду дигидрозеатина максимальная иммунореактивность соответствует дигидрозеатину и его рибозиду. Для определения изопентениладенина и его рибозида нужно использовать, соответственно, антисыворотку к рибозиду изопентениладенина. Таким образом, применение определенной тест-системы позволяет судить о суммарном содержании ряда производных цитокининов в неразделенном водном остатке или бутанольном экстракте. В случае использования тест-системы с антисывороткой к зеатин-рибозиду — это зеатин, его рибозид и риботид, а также 9-N-глюкозид. Чтобы определить содер-

Таблица 2

**Специфичность тест-систем для определения  
цитокининов**

Соединения	Тест-системы для определения гормона		
	З/ЗР	ИПА/ИП	ДЗР/ДЗ
Зеатин (З)	31	0,3	1,8
<i>Цис</i> -зеатин	5,6	—	—
Зеатин-рибозид (ЗР)	100	1,6	1,6
Зеатин-риботид (ЗН)	95	—	—
9-N-глюкозид зеатина (9ГЗ)	95	0,3	1,5
Дигидрозеатин (ДЗ)	8	1,9	40
Дигидрозеатин-рибозид (ДЗР)	6	0,9	100
Изопентениладенин (ИП)	0,9	63	0,1
Изопентениладенозин (ИПА)	0,6	100	0,2
О-глюкозид зеатина (ОГЗ)	0	0	0

жание индивидуальных цитокининов, необходимо хроматографическое фракционирование водного остатка или бутанольного экстракта (тонкослойная, бумажная, колоночная хроматография и др.) с последующим иммуноанализом цитокининов. Проведение ТФИФА цитокининов отличается от описанного выше иммуноанализа ИУК и АБК лишь по некоторым деталям на стадии «Реакция с антителами».

### **3.1. Сенсibilизация**

В рабочие лунки планшета внести по 200 мкл раствора конъюгата ЗР-белок, приготовленного на карбонатном буфере в указанном разведении. Выдержать планшет в течение 16—20 ч в холодильнике при температуре +2...+4 °С для адсорбции конъюгата на полистироле.

### **3.2. Реакция с антителами**

3.2.1. После завершения окончания этапа адсорбции планшет промыть раствором «ФТ».

3.2.2. Во все лунки калибровочного ряда внести по 100 мкл бидистиллированной воды и приготовить десятикратные разведения стандартного раствора гормона —



зеатин-рибозида или зеатина. В лунки бесконкурентного варианта стандартный гормон не вносить.

3.2.3. Растворить сухие остатки бутанольных экстрактов опытных образцов, находящихся в фарфоровых чашках, в 100 мкл 80%-го этанола. Затем добавить 900 мкл бидистиллированной воды и, тщательно перемешав, внести по 100 мкл полученного раствора в рабочие лунки планшета, кроме лунок калибровочного ряда (4—8 лунок для каждого образца).

3.2.4. Приготовить рабочее разведение антисыворотки к ЗР на «ФТБ» в указанном на флаконе соотношении и внести по 100 мкл во все лунки, включая лунки ряда для калибровочного графика. Планшет выдержать при +37 °С в термостате в течение одного часа.

3.2.5. После реакции с антителами жидкость из лунок удалить и промыть три раза раствором «ФТ».

### **3.3. Посадка пероксидазы**

Приготовить рабочее разведение антивидового пероксидазного конъюгата для ЗР на «ФТБ», как указано на этикетке набора. Внести по 200 мкл во все используемые лунки и выдержать планшет два часа в термостате при +37 °С. Время инкубации антивидового пероксидазного конъюгата обычно указывается в наборе иммунореагентов. Если продолжительность инкубации особо не оговорена, то оптимальная — два часа. Затем лунки промыть три раза раствором «ФТ».

### **3.4. Цветная реакция**

Проводится в полном соответствии с тем, как описано в п. 3.4 работы 1 для определения ИУК и АБК.

## **4. Приготовление стандартного раствора цитокинина**

Взять навеску химически чистого препарата зеатин-рибозида или зеатина 1 мг. Перенести в маленькую коническую мерную пробирку и добавить несколько капель (около 0,1 мл) 0,1 N КОН или NaOH. Нагреть до полного растворения навески, довести до 1 мл водой. Охладить при комнатной температуре и хранить в морозильнике.

Для растворения можно использовать вместо щелочи  $\text{HCl}$  или  $\text{H}_2\text{SO}_4$ .

## 5. Приготовление водонасыщенного бутанола

К 1 л бутанола добавить 50 мл бидистиллированной воды. Смесь интенсивно встряхивать в течение 1—2 мин в делительной воронке, затем дать отстояться до разделения фаз. Если вся вода перешла в бутанол, то еще приливать воду до тех пор, пока не произойдет разделение фаз после интенсивного взбалтывания. Излишки воды удалить.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

*Веселов С. Ю.* Использование антител для количественного определения, очистки и локализации регуляторов роста растений. Уфа, 1998.

*Веселов С. Ю., Кудоярова Г. Р.* Принципы иммуноанализа применительно к определению фитогормонов // Иммуноферментный анализ регуляторов роста растений. Применение в физиологии растений и экологии. Уфа, 1990. С. 8—22.

*Головацкая И. Ф., Каранчук Р. А.* Практикум по физиологии растений. Ростовые вещества. Томск, 1995.

*Егоров А. М. и др.* Теория и практика иммуноферментного анализа. М., 1991.

*Кефели В. И., Кислин Е. Н.* Газохроматографическое определение абсцизовой и индолил-3-уксусной кислот в растительных тканях // Физиология растений. 1982. Т. 29, вып. 2. С. 407—413.

*Кефели В. И., Коф Э. М., Власов П. В., Кислин Е. Н.* Природный ингибитор роста — абсцизовая кислота. М., 1989.

*Кефели В. И., Турецкая Р. Х., Коф Э. М., Власов П. В.* Определение биологической активности свободных ауксинов и ингибиторов роста в растительном материале // Методы определения фитогормонов, ингибиторов роста, дефолиантов и гербицидов. М., 1973. С. 7—21.

*Кефели В. И., Чайлахян М. Х., Турецкая Р. Х. и др.* Комплексный метод определения природных регуляторов роста: биотесты // Физиология растений. 1975. Т. 22, вып. 6. С. 1291—1298.

*Кислин Е. Н.* Определение природных фитогормонов с помощью хроматографических методов. СПб., 2004.

*Коф Э. М.* Методы определения природного ингибитора роста абсцизовой кислоты // Рост растений и природные регуляторы. М., 1977. С. 154—170.

*Кудоярова Г. Р., Веселов С. Ю., Каравайко Н. Н. и др.* Иммуноферментная тест-система для определения цитокининов // Физиология растений. 1990. Т. 37, вып. 1. С. 193—199.

*Кудоярова Г. Р., Коф Э. М., Гюли-Заде В. З. и др.* Специфичность иммуноферментного анализа ауксинов. Значение экстракционной очистки растительного материала // Иммуноферментный анализ регуляторов роста растений. Применение в физиологии растений и экологии. С. 23—32.

*Кулаева О. Н.* Цитокинины, их структура и функция. М., 1973.

*Мазин В. В., Шашкова Л. С.* Изучение природных цитокининов // Рост растений и природные регуляторы. С. 122—142.

*Муромцев Г. С., Чкаников Д. И., Кулаева О. Н., Гамбург К. З.* Основы химической регуляции роста и продуктивности растений. М., 1987.

*Плотникова И. В.* Экстракция и очистка индольных ауксинов // Рост растений и природные регуляторы. С. 65—79.

*Поздова Л. М.* Определение абсцизовой кислоты в растительном материале // Методы определения фитогормонов, ингибиторов роста, дефолиантов и гербицидов. С. 90—95.

*Сабинин Д. А.* Физиология развития растений. М., 1963.

*Palni L. S. M., Tay S. A. B., MacLeod J. K.* GC-MS Methods for Cytokinins and Metabolites // Gas Chromatography / Mass Spectrometry: Modern Methods of Plant Analysis. New Ser. Berlin, 1986. Vol. 3. P. 214—253.

*Rivier L.* GS-MS of Auxins // Ibid. P. 146—188.

Учебное издание

## МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ФИТОГОРМОНОВ:

твёрдофазный иммуноферментный анализ  
абсцизовой кислоты, ауксинов и цитокининов

Руководство к лабораторным занятиям  
большого спецпрактикума по физиологии  
и биохимии растений

Составитель  
Борзенкова Раиса Антоновна

Редактор и корректор С. Г. Галинова  
Компьютерная верстка Н. П. Сорокиной

Оригинал-макет подготовлен  
в редакционно-издательском отделе УрГУ

План выпуска 2006 г., поз. 11.

Подписано в печать 29.03.2006. Формат 60×84/16. Бумага офсетная.  
Гарнитура Times. Уч.-изд. л. 2,18. Усл. печ. л. 2,56. Тираж 300 экз. Заказ .

Издательство Уральского университета.  
620083, Екатеринбург, пр. Ленина, 51.

Отпечатано в ИПЦ «Издательство УрГУ».  
620083, Екатеринбург, ул. Тургенева, 4.